Ξ

Главная » Оптика атмосферы и океана » 2019 (25) » Труды

# XXV Международный Симпозиум "Оптика атмосферы и океана. Физика атмосферы"

30 июня - 5 июля 2019 года, Новосибирск



Труды

Оптика атмосферы и океана. Физика атмосферы: Материалы XXV Международного симпозиума.

Электронный ресурс

Томск: Издательство ИОА СО РАН.

ISBN 978-5-94458-176-1 © ИОА СО РАН им. В.Е. Зуева, 2019

#### Содержание

- 1. Пленарные доклады
- 2. Конференция А. Молекулярная спектроскопия и атмосферные радиационные

процессы

- 3. Конференция В. Распространение излучения в атмосфере и океане
- 4. Конференция С. Исследование атмосферы и океана оптическими методами
- 5. Конференция D. Физика тропосферы

6. Конференция Е. Физика средней и верхней атмосферы

- 2002 (9)
- 2001 (8)
- 2000 (7)
- 1999 (6)

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

ИМПУЛЬСНЫЕ ЛАЗЕРЫ НА ПЕРЕХОДАХ АТОМОВ И МОЛЕКУЛ

РАБОЧАЯ ГРУППА "АЭРОЗОЛИ СИБИРИ"

РАСПРОСТРАНЕНИЕ РАДИОВОЛН

КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ "МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ, ТЕХНОЛОГИИ И ЭКОЛОГИЯ"

ХХУ МЕЖДУНАРОДНАЯ

### КОНФЕРЕНЦИЯ А

#### МОЛЕКУЛЯРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ И АТМОСФЕРНЫЕ РАДИАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ

## ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КОЛЛАГЕНА И ЭЛАСТИНА ПРИ ЛИМФЕДЕМЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОГОФОТОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Николаев В.В.<sup>1,2</sup>, Сандыкова Е.А.<sup>1,3</sup>, Курочкина О.С.<sup>4</sup>, Вражнов Д.А.<sup>1,2</sup>, Кривова Н.А.<sup>1</sup>, Кистенев Ю.В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Томский Государственный Университет, Томск, 634050 Россия <sup>2</sup>Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, 634055 Россия <sup>3</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск 634050 Россия <sup>4</sup>АНО "НИИ микрохирургии", Томск 634063 Россия

e-mail: vik-nikol@bk.ru, katrin\_nemchenko@mail.ru, kurochkinaos@yandex.ru,

denis.vrazhnov@gmail.com, nakri@res.tsu.ru, yuk@iao.ru

Ключевые слова: Автофлуоресенция, Генерация второй гармоники, SAAID

Методы двухфотонной микроскопии получили широкое распространение в задачах изучения биологических объектов, в частности кожи, благодаря возможности изучать объекты как на поверхности так и на глубине без привлечения дополнительных флуорофоров за счет эндогенной автофлуоресенции. В данной работе применены методы анализа изображений сигнала АФ и ГВГ для оценки состояния кожи при развитии лимфедемы. Показано, что для групп здоровой ткани и лимфедематозной с использованием гистограмм распределения SAAID можно выявить изменения тканей.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы, направление Ш.23. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Томской области в рамках научного проекта №18-42-703012

Заболевание лимфедема означает хроническое прогрессирующее заболевание лимфатической системы, которое связано с недостаточной циркуляцией лимфы и последующим накоплением интерстициальной жидкости с высоким содержанием белка, что приводит к воспалению, гипертрофии жировой ткани и распространению фиброза с необратимым структурным повреждением [1]. На практике это выглядит как отек пораженных тканей. Лимфедема поражает лимфатические узлы, дерму, подкожную клетчатку. Модель лимфедемы была получена на лабораторных крысах на лапах и хвостах. В качестве реперного метода использовалось гистологическое исследование.

Процесс измерения биологических объектов при помощи однофотонного излучения обычно ограничен внефокусными засветками, это ограничение в значительной мере преодолевается в конфокальной микроскопии использованием точечной диафрагмы для фильтрации фотонов вне фокуса.

A-17

С использованием двухфотонного возбуждения можно получать оптические срезы в трех измерениях без диафрагмы в областях выше и ниже фокальной плоскости за счет использование длины волны вдвое большей, чем в конфокальной микроскопии.

Явление двухфотонного возбуждения теоретически было разработано около века назад, однако экспериментально подтверждено только после появления лазеров. Двухфотонное возбуждение возникает при одновременном поглощении двух фотонов в единичном квантовом событии. Под одновременностью в данном случае понимаются события, интервал между которыми очень мал, порядка 10<sup>-18</sup> секунды. Для того чтобы обеспечить достаточное количество фотонов поглащающихся одновременно, плотность фотонов должна быть в милион раз большей чем для однофотонного поглощения. Таким образом, для генерации достаточной двухфотонной флуоресенции требуются лазеры с высокой мощностью. Более того двухфотонные процессы имеют свойство генерации кратных гармоник, в частности эффект генерации второй гармоники (ГВГ), который позволяет дополнительно изучать специфические объекты.

Методы диагностики заболеваний, основанные на многофотонной микроскопии, не оказывают влияния на объект излучения, а также позволяют получать изображения практически в реальном времени с субмикронным разрешением [2-4].

Методы двухфотонной микроскопии получили широкое распространение в задачах изучения биологических объектов, в частности кожи, в силу возможности изучать такие объекты не только на поверхности, но и на глубине без привлечения дополнительных флуорофоров только за счет эндогенной автофлуоресенции. Так при изучении сосочкового слоя кожи и дермы можно визуализировать при помощи автофлуоресенции (АФ) эндогенных флуорофоров эластин, а при помощи генерации второй гармоники коллаген, т.е. основных компоненты дермы, отношение которых отвечает за состояние кожи [5].

В данной работе рассматривается применение методов анализа изображений сигнала АФ и ГВГ для оценивания состояния кожи при развитии лимфедемы.

Для воссоздания модели лимфедемы были использовано 30 голов самцов крыс Wistar в возрасте 8-10 недель (масса 200-250 г). Крысы содержались в изолированном вентилируемом помещении вивария Института биологии и биофизики Томского государственного университета. В помещении поддерживалась температура  $20 \pm 2.0$  °C, влажность воздуха 60% (и условия 12 часов свет/ 12 часов темнота). Все животные были промаркированы и содержались в течение 7 суток на карантине по 5 крыс в одной клетке, при свободном доступе к воде и пище (стандартный рацион для крыс). Все экспериментальные процедуры были утверждены в Комиссии по этическим правилам Томского государственного университета. В

A-18

качестве модели развития лимфедемы была выбрана методика, описанная в [6]. Данная методика основана на резекции подколенного узла на одной лапе животного, вторая лапа использовалась для контроля.

Измерения были получены на двухфотонном микроскопе MPTflex (Jenlab, Германия). Пространственное разрешение устройства составляет около 1 мкм вдоль плоскости XY и ~ 2 мкм по оси Z. Длина волны лазера составляла 760 нм, глубина сканирования была выбрана от 0 до 110 мкм. Данные для AФ и ГВГ сигналов были записаны на матрице размером 512x512 пикселей, размер области сканирования выбран 70x70 мкм.





Рисунок 1 – (а) Пример пространственного распределение АФ и ГВГ для здоровой ткани (б) Пример разбиения изображения на блоки. (в) - Гистограммы среднего значения отношения АФ/ГВГ для изображений здоровой и лимфедематозной ткани

Для уменьшения влияния шумовой составляющей и увеличения точности оценки данных было использовано разбиение полученных изображений на блоки. Схема разбиения изображения на блоки представлена на рисунке 1, где *l* – количество пикселей в изображении, *h* – количество пикселей в блоке. В работе было использовано разбиение на непересекающиеся блоки, для того чтобы одна и та же область не была учтена дважды. Блоки с низкой интенсивностью фильтровались.

Индекс старения кожи SAAID является неинвазивным объектвиным параметром для определения статуса коллагена 1 в дерме, который может быть использован для описания старения на различных областях кожи in-vivo [7], а так же позволяет выявить поврежденную или кожу с паталогиями[8]. Индекс SAAID определяется формулой

#### SAAID = (SHG-AF)/(SHG+AF).

Так при помощи метода скользящего окна было оценен индекс SAAID для каждого блока, и построена гистограмма распределения. Ширина блока была выбрана методом перебора и равна 32 пикселям.

Приведенные результаты демонстрируют увеличение ширины распределения и в целом повышение максимума отношения АФ/ГВГ. Таким образом, можно сделать вывод, что изменения в распределении вызваны изменениями в структуре ткани. Для здоровой ткани областей со значениями отношения АФ/ГВГ больше 1.1 нет, в то время как для поврежденной ткани эти изменения носят систематических характер.

1. Rockson S.G. Lymphedema. // Am J Med. 2001. 110:288–295

2. Zipfel W.R., Williams RM, Webb W.W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences // J. Nat Biotechnol. 2013. 21:1369-1377

3. *Koehler M.J., König K, Elsner P.* In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography // Opt. Lett. 2006. 19:2879-2881

4. *Zoumi A, Yeh A, Tromberg B.J.* Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence onlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences // Proc Natl Acad Sci USA. 2002. 99:11014-11019

5. *Sugata K., Osanai O., Sano T., Takema Y.* Evaluation of photoaging in facial skin by multiphoton laser scanning microscopy onlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences // Skin res technol 2011. Feb;17(1):1-3. Doi: 10.1111/J.1600-0846.2010.00475.X

6. Загуменников С.Ю., Ковалев А.Г. Патент RU 2322698

7. *Gonzaga E.R.* Role of UV light n photodamage, skin ageing, and skin cancer: Importance of photoprotection // Am. J.Clin. Dermatol. 2009, 10 (Suppl. 1), 19-24.

8. Zouboulis C.C. Makrantonaki E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin ageing // Clin. Dermatol. 2011, 29, 3-14.